

Review

VAŽNOST ANALIZE KONDENZATA IZDAHNUTOG ZRAKA U PLUĆNIM BOLESTIMA

Ivana MALOČA i Davor PLAVEC

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Primljeno u listopadu 2005.

Prihvaćeno u veljači 2006.

Kondenzat izdahnutog zraka (KIZ) sadržava aerosoliziran sekret dišnih putova i hlapljive sastojke koji pružaju neinvazivan uvid u biokemijske i upalne procese u plućima. Značajan porast interesa za KIZ rezultat je prepoznavanja da u plućnim bolestima ta lako skupljiva tekućina ima mjerljive karakteristike koje se razlikuju od zdravog stanja. KIZ pruža uvid u redoks reakcije unutar pluća, acidobazni status te stupanj i tip upale u akutnoj i kroničnoj fazi astme, kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti, adultnom respiratornom distres sindromu, cističnoj fibrozi i drugim bolestima dišnog sustava. Karakteriziran nepoznatim i varijabilnim stupnjevima razrjeđenja, KIZ ne pruža preciznu informaciju o koncentraciji pojedinog markera unutar sekreta dišnih putova, ali pokazuje kada se koncentracija razlikuje između zdravog i bolesnog stanja u dišnom sustavu. Zbog pristupačnosti i jednostavnosti izvođenja, KIZ postaje integralni dio budućih kliničkih istraživanja, a nakon što se prevlada problem standardizacije, on bi se mogao iskoristiti u dijagnosticiranju i praćenju terapije bolesti dišnog sustava.

KLJUČNE RIJEČI: *biomarkeri, citokini, koncentracija vodikovih iona, oksidativni stres, plućne bolesti, vodikov peroksid*

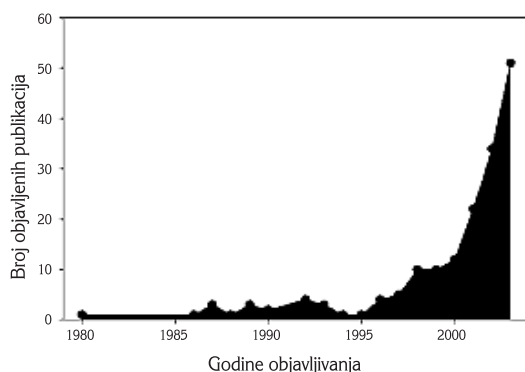
Bolesti pluća i dišnog sustava vrlo su česte (oko 29% dijagnoza unutar primarne zdravstvene zaštite) (1). To se može objasniti činjenicom da dišni sustav ima vrlo veliku površinu izloženu krvi i vanjskoj okolini pa je podložan prodoru infektivnih i neinfektivnih čimbenika kao što su duhanski dim, ispušni i industrijski plinovi te inhalacijski alergeni. Tako nastale patofiziološke promjene mogu se proučavati različitim metodama. Osnovne dijagnostičke metode su anamneza, klinički pregled, slikovni prikazi prsnog koša (radiogram prsnog koša, kompjutorizirana tomografija pluća) i funkcionalni plućni testovi. Nadalje, analiziraju se upalni medijatori iz plazme i urina, ali ti podaci prije reflektiraju sistemsku upalu nego upalu lociranu u dišnim putovima čime je smanjena osjetljivost i specifičnost dobivenih podataka. Za preciznije informacije o dišnom sustavu potrebno je primijeniti poluinvazivne metode kao induciranje sputuma ili invazivne metode poput bronhoskopije

s bronhoalveolarnim lavatom (BAL) i biopsije. S obzirom na njihovu invazivnost one se provode samo kada postoji jasna indikacija. Treba uzeti u obzir mogućnost izazivanja bronhospazma, oštećenja sluznice i razrjeđenja uzoraka prilikom izvođenja tih metoda, što dovodi do iskrivljenih rezultata. Upravo zbog nedostataka navedenih metoda javila se potreba za razvijanjem novog načina proučavanja lokalnoga patološkog procesa u dišnim putovima poput analize izdahnutog zraka.

Izdahnuti zrak se sastoji od plinovite faze, koja sadržava hlapljive spojeve poput dušikova oksida i ugljikova monoksida, i vodom zasićene faze koja sadržava čestice aerosola. Kako bi se omogućilo njegovo ispitivanje, izdahnuti je zrak potrebno kondenzirati čime se dobiva tekućina poznata kao kondenzat izdahnutog zraka (KIZ) čije molekule reflektiraju sadržaj bronhoalveolarnog sekreta (2). Time je omogućeno praćenje promjena u dišnom

sustavu uzrokovanih oksidativnim oštećenjem i upalom, kao i učinka liječenja.

Pojam KIZ-a poznat je unatrag 20-ak godina. Prve studije u kojima su u KIZ-u otkriveni površinski aktivni sastojci, uključujući plućni surfaktant, objavljene su u Rusiji tijekom 80-ih godina (3). Od tada je zamjetan porast publikacija o toj temi, osobito zadnjih desetak godina, što se vidi na slici 1. Međutim, ukupan broj objavljenih studija još je uvijek manji od 300, a samo neke od njih imaju detaljan osvrt na metodološki dio istraživanja. Ta činjenica ograničava stvaranje smjernica utemeljenih na dokazima. Grupa istraživača iz American Thoracic Society (ATS) / European Respiratory Society (ERS) Task Force učinila je prvi korak prema standardizaciji objavivši prve smjernice koje bi omogućile neposrednu usporedbu podataka iz različitih centara u budućim istraživanjima (4).



Slika 1 Grafički prikaz objavljenih publikacija o KIZ-u (preuzeto s: <http://www.respiratoryresearch.com> – Exhaled Breath Condensate: An Introduction)

U ovom su pregledu predstavljena dosadašnja saznanja o KIZ-u objavljena u stručnim i znanstvenim časopisima na engleskom jeziku.

PRIKUPLJANJE KIZ-a

Prikupljanje uzoraka KIZ-a jednostavna je i lako izvediva metoda. Obavlja se s pomoću kondenzatora, uređaja koji dopušta neinvazivnu kolekciju neplinovitih komponenti zraka iz izdahnutog zraka. Uzorak se skuplja s pomoću oralnog nastavka na kondenzatoru. KIZ se može prikupiti i putem nazalne kanile (5) i endotrahealne tube (6, 7, 8) čime se proširuje krug potencijalnih ispitanika. U većini studija metoda se izvodi ovako: ispitanik se uputi da diše kroz nastavak za usta koji je spojen na kondenzator.

Ispitanik diše normalnom frekvencijom disanja jer bi hiperventilacija mogla izazvati isušivanje sluznice dišnog sustava, kalorijsko opterećenje te time podražaj živčanih završetaka i bronhospazam. U većini studija ispitanicima je disanje kroz nos onemogućeno kvačicom, ponajprije zbog dvaju razloga: prvi je razlog što je više moguće smanjiti dotok sekreta iz nosnih hodnika u donje dišne putove tijekom udisaja; drugi je razlog osigurati da sav izdahnuti zrak izađe kroz usta, a ne kroz nos. Međutim još nema dovoljno podataka koji bi usporedili sastav KIZ-a dobivenog prikupljanjem s nosnom kvačicom ili bez nje.

Princip stvaranja i sastav KIZ-a

Princip stvaranja kondenzata je ovaj. Kada zrak napušta gornje dišne putove, njegova je temperatura 37 °C. Izdahnuti zrak prolazi kroz valvularni blok kod kojeg su udisaj i izdisaj odvojeni. Nakon toga je usmjeren u ohlađenu cijev, lamelarni kondenzator, čija je temperatura od 0 °C do –20 °C ovisno o načinu hlađenja. Aerosol i ostali neplinoviti sastojci se kondenziraju na unutrašnjoj stijenci lamelnog kondenzatora i kapljice padaju u posudu za prikupljanje uzoraka. KIZ se pohranjuje u hladnjak na –70 °C te može biti naknadno analiziran za različite medijatore. Smrznuti kondenzat može biti pohranjen do analize te ostaje stabilan nekoliko mjeseci (7). Problem nestabilnosti pojedinih sastojaka KIZ-a moguće je riješiti dodatkom reagensa za analizu neposredno nakon prikupljanja KIZ-a te pohranom tako stabiliziranog spoja u hladnjak (9, 10). Važnost prikupljanja i pohrane kondenzata na tamno mjesto kako bi se izbjegla promjena supstancija još nije istražena.

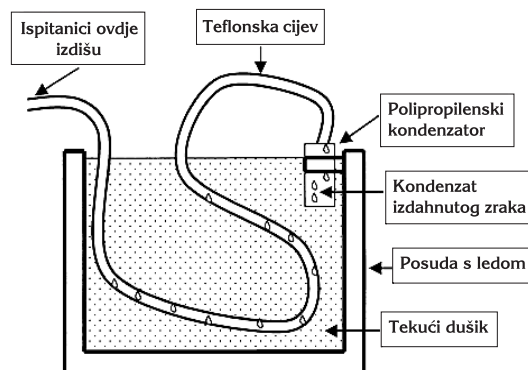
KIZ je načinjen od tri komponente. Većinu kondenzata čini vodena para (>99 %) koja se hlađenjem kondenzira (11). Samo mali udio kondenzata čine nehlapljive molekule koje potječu iz sekreta dišnih putova (12). Te se molekule dijele na vodotopljive spojeve (npr., amonijak, vodikov peroksid, etanol) i čestice aerosola iz donjih dišnih putova (npr., citokini, lipidi, surfaktant, ioni, oksidativni spojevi). Tijekom normalne frekvencije disanja količina aerosolnih čestica se kreće od 0,1 čestica cm⁻³ do 4 čestica cm⁻³ srednjeg promjera od 0,3 μm (13), iako se ovamo ne ubrajaju najmanje čestice, od kojih neke mogu biti prisutne u značajnijoj količini. Količina čestica ovisi o brzini zraka i površinskoj napetosti sekreta (veća brzina i manja napetost dovode do veće proizvodnje aerosola). Turbulencija i veći broj rubova na točkama

grananja mogu pojačati stvaranje čestica. Mehanizam kojim su čestice prisutne u izdahnutom zraku još nije jasan.

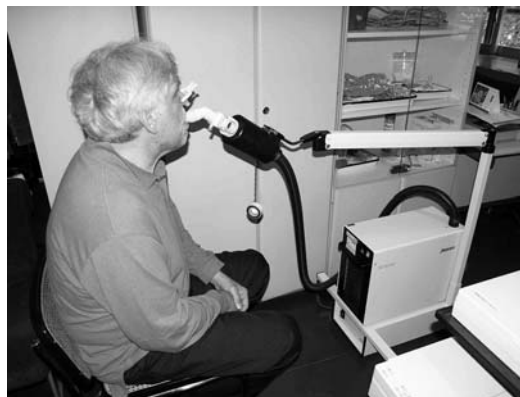
Većina istraživača koji se bave proučavanjem KIZ-a pozornost usmjeruje na upalne medijatore, poput vodikova peroksida, 8-izoprostana, nitrita, amonijaka, eikozanoida i citokina te nešto manje na nukleinske kiseline. Analiza navedenih spojeva može pružiti pogled u patofiziologiju plućnih bolesti poput astme, cistične fibroze (CF), kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) i virusnih respiratornih infekcija. U tim stanjima moguće je proučavati egzacerbacijsku fazu bolesti u kojoj se invazivne pretrage rijetko izvode. Također je moguće istraživati proteine, lipide, deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) i ribonukleinsku kiselinu (RNA) iz mikroorganizama, čime ova metoda postaje dostupna za istraživanje mikrobiolozima, genetičarima i farmakolozima.

Uređaji za prikupljanje KIZ-a

U većini studija uređaji za prikupljanje KIZ-a načinjeni su unutar laboratorija te se sastoje od usnika s jednosmjernom valvulom spojenom na cijev građenu od različitog materijala (Teflon, polipropilen) (14, 15, 16), duljina i promjera, ili staklene komore s dvostrukim zidom (17). Bitno je da je materijal s kojim KIZ dolazi u kontakt kemijski inertan. Slika 2 prikazuje shemu kondenzatora sastavljenog unutar laboratorija. Danas postoje komercijalno dostupni kondenzatori različitih proizvođača koji su uglavnom sastavljeni od metalne cijevi obložene Teflonom i ohlađene na -20 °C. Primjer takvog kondenzatora prikazan je na slici 3. Njima se prevladavaju problemi vezani za standardizaciju načina disanja, ekspiratornog protoka, duljine, materijala i promjera cijevi. Glavna je



Slika 2 Shematski prikaz kondenzatora (4)



Slika 3 Prikaz komercijalno dostupnog kondenzatora

prednost takvih uređaja brzo smrzavanje uzorka, što može biti važno za kemijski nestabilne komponente poput leukotrijena E4 i 8-izoprostana. U novije vrijeme proizvode se uređaji s negativnim tlakom čime je omogućeno prikupljanje KIZ-a bez suradnje bolesnika (18). Prednost tih uređaja je njihova primjena na sve dobne skupine (prematurusi, starije teško bolesne osobe), primjena u različitim situacijama (tijekom spavanja ili noći, tijekom vježbanja ili napora), izbjegavanje kontaminacije slinom i direktno uzorkovanje u komoru za prikupljanje.

Trajanje i temperatura kondenzacije

Duljina prikupljanja KIZ-a nije jasno definirana. U nekim studijama vrijeme skupljanja može biti 2 minute (7), dok neki istraživači zahtijevaju disanje dulje od jednog sata. Prema većini autora relevantno je uzimanje uzoraka 10 minuta zbog dvaju praktičnih razloga: 1) u tom se periodu kod odraslih i djece starije od 4 godine dobiva 1 mL do 3 mL kondenzata (za analizu je potreban najmanje 1 mL); i 2) ta duljina uzimanja ne izaziva umor ispitanika. Jedina studija koja je direktno uspoređivala utjecaj različitog vremena prikupljanja pokazala je da nema promjene razine pH u vremenu prikupljanja od 2 min i 7 min kod zdravih ispitanika (7). U drugim studijama u kojima se KIZ prikupljao 10 min, 15 min i 20 min, iako nisu učinjene direktne usporedbe, nije bilo razlika u koncentraciji vodikova peroksida (H_2O_2), nitrita/nitrata, 8-izoprostana i adenoizina.

Kondenzacija se može postići na temperaturi oko 0 °C čime se dobiva KIZ u tekućem obliku. Uporaba nižih temperatura za kondenzaciju zraka rezultira prikupljanjem smrznutog materijala. Ovisno o željenoj temperaturi kondenzacije rabe se različiti mediji poput

leda, suhog leda ili tekućeg dušika. Problem koji se može javiti kada se za hlađenje rabi tekući dušik ili suhi led jest potpuna opstrukcija cijevi za prikupljanje zbog vrlo niskih temperatura (može izazvati hiperinflaciju pluća kod mehanički ventiliranih bolesnika). S pomoću leda ili duljim prikupljanjem uzorka moguće je smanjiti broj tih komplikacija.

Prednosti i nedostaci metode

KIZ pruža neinvazivnu procjenu stanja dišnog sustava u stvarnom vremenu. Njegove prednosti navedene su na tablici 1. Metoda je jednostavna i visoko reproducibilna (19). Osim toga, KIZ reflektira promjene primijećene drugim invazivnim metodama (20-22). Ne oštećuje respiratornu sluznicu te nema dilucijskog čimbenika koji je opažen kod uzoraka dobivenih bronhoskopijom i lavažom. Što se tiče ispitanika tu praktički nema ograničenja. KIZ se može primijeniti na osobama koje spontano dišu i onima koji se mehanički ventiliraju. Situacije u kojima se ne izvodi KIZ su iatrogeno uvjetovane. KIZ se ne izvodi ako je u prethodnom tjednu bio izveden pregled bronhalnog sustava (BAL, biopsija), zbog činjenice da sama invazivnost tih metoda može dovesti do promjene sastava sekreta te ako su prije tri dana izvođeni specifični ili nespecifični bronhalni provokacijski testovi, zato što bi oni mogli dovesti do upalnih promjena. U slučaju izvođenja forsiranog disanja i testova s fizičkim opterećenjem treba pričekati do 10 min prije uzimanja KIZ-a. Nadalje, godine nisu limitirajući faktor. KIZ također može osigurati sekvencijalno i longitudinalno prikupljanje uzoraka donjih dišnih putova bez potrebe za invazivnijim testovima. Iako se još uvijek primjenjuje samo u istraživanjima, kratko vrijeme za prikupljanje uzoraka i potreba za minimalnom kooperabilnošću čine ovu

metodu pogodnom za buduću kliničku primjenu u rutinskim pregledima i probirnim testovima.

Međutim, metoda ima određena ograničenja (tablica 1). Još nije riješen problem standardizacije izvođenja metode s gledišta prikupljanja, pohrane i izbora metoda za određivanje parametara. Sljedeći nedostatak je da se ne zna s koje razine dišnih putova potječu istraživani spojevi. Problem oko različitog razrjeđenja i nepostojanje pouzdanog markera dilucije sprječava pouzdanu procjenu koncentracije markera u sekretu. Međutim, taj se problem javlja i kod inducirano sputuma i kod bronhoalveolarnog lavata. Osim markera koji reflektiraju oksidativni stres, postoji mogućnost analiziranja i molekula poput DNA, mikroorganizama koji bi također bili korisni u kliničkoj primjeni. Njihovo istraživanje još uvijek zaostaje za studijama o oksidativnom stresu. Na kraju, malen broj studija uzrok je zašto se ne mogu donijeti konačni zaključci o korisnosti KIZ-a u kliničkoj primjeni.

ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PRIKUPLJANJE KIZ-a

Dob i spol ispitanika

Najveća baza podataka o varijablama koje utječu na koncentraciju biomarkera u KIZ-u dostupna je za vodikov peroksid (H_2O_2). Kod djece koncentracija H_2O_2 nije ovisna o dobi, međutim kod starije populacije nađene su više razine nego kod mlađih odraslih ispitanika (23-25). Težina i visina nisu utjecale na koncentraciju H_2O_2 i volumen KIZ-a kod odraslih ispitanika (26), međutim takvi podaci za ostale medijatore nisu dostupni. Nisu objavljeni ni podaci o potencijalnom utjecaju rase, spola i položaja tijela ispitanika na koncentraciju biomarkera u KIZ-u.

Tablica 1 Prednosti i nedostaci KIZ-a

Prednosti
jednostavna, pristupačna metoda, može se rabiti izvan zdravstvene ustanove (npr. škola, radna mjesta)
visoko reproducibilna
ne oštećuje respiratornu sluznicu i isključen je čimbenik razrjeđivanja
dostupna širokom spektru bolesnika
longitudinalno prikupljanje uzoraka
analiza nehlapljivih spojeva koji su povezani s plućnom patofiziologijom
Nedostaci
još uvijek nedovoljna standardizacija uzimanja uzorka
nedostatak dokaza o podrijetlu čestica aerosola
nije provedeno dovoljno istraživanja o korelaciji koncentracije markera u uzorku i u dišnim putovima
manja poznata korist analize biomarkera koji nisu vezani za oksidativni stres
malen broj studija

Uzorak se može prikupljati kod djece od 3 do 4 godine istom metodom kao i za odrasle (24, 27). Kod novorođenčadi bi se mogla primijeniti maska za lice (28) ili kontinuirana aspiracija nazalnom kanilom (18, 29). Problem koji se javlja kod djece je gubitak interesa, zbog čega vrijeme prikupljanja KIZ-a treba svesti na minimum.

Način disanja

Volumen KIZ-a ne ovisi o parametrima plućne funkcije uključujući (forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV₁) i forsirani vitalni kapacitet (FVC) kod zdravih ispitanika i kod bolesnika s KOPB-om (26). Za sada nema dokaza koji pokazuju da promjene u kalibru dišnih putova uzrokuju razlike u otpuštanju medijatora ili razrjeđivanju KIZ-a, ali to pitanje još nije sistematski razjašnjeno. Postoje podaci koji otkrivaju da nema promjene u pH KIZ-a nakon akutne opstrukcije dišnih putova induciranih metakolinom (7). Što se tiče kašlja (spontanog ili induciranih), nema objavljenih podataka o njegovu potencijalnom utjecaju na volumen i sadržaj KIZ-a.

Nadalje, valja naglasiti da su koncentracije nekih biomarkera, poput H₂O₂, ovisne o ekspiratornom protoku, što upućuje na to da je podrijetlo te molekule uglavnom iz provodnog dijela dišnih putova (16).

Utjecaj pušenja

Akutna i kronična izloženost duhanskom dimu značajno utječe na H₂O₂, 8-izoprostan i nitrotirozin (30-34). Kod zdravih ispitanika pušenje uzrokuje povećanje njihovih razina i neutrofilne kemotaktičke aktivnosti, dok nema utjecaja na koncentraciju interleukina 1β ili čimbenika tumorske nekroze-α (30-34). Kod astmatičara pušenje također uzrokuje povišenje H₂O₂ (35), dok kod bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti (KOPB) nije opažena razlika u koncentraciji H₂O₂ i 8-izoprostana između pušača i nepušača (36-38). Preporuka je da se ispitanik suzdrži od pušenja najmanje tri sata prije uzimanja uzorka kako bi se spriječio akutni utjecaj pušenja na razinu medijatora.

Kontaminacija

Kod ove metode potrebno je što je moguće više isključiti problem kontaminacije. Egzogeni kontaminacija (iz okoliša) isključuje se pravilnom dezinfekcijom kondenzatora. Pod time se razumijeva uporaba dezinficijensa koji isparava u cijelosti (npr.

peroctena kiselina). Unutrašnju kontaminaciju sprječavamo na više načina. Potrebno je osigurati da se izdahnuti zrak više ne vraća u sustav. To se postiže dvosmjernom nepovratno dišućom valvulom kod koje su udisaj i izdisaj odvojeni. S obzirom na to da je pozornost usmjerena na prikupljanje uzorka iz donjih dišnih putova, potrebno je kontaminaciju slinom smanjiti na minimum. U tu svrhu dostupne su nam različite tehnike poput posebnog oblika usnika koji ne dopušta cijeđenje sline u uzorak, postavljanje kondenzatora na višu razinu od usta i odvajanje nastavka za usta od kondenzatora duljom cijevi. Ostali načini su da ispitanici ispiru usta vodom i/ili gutaju nakupljenu slinu prije davanja uzorka. Za kontrolu kvalitete uzorka s obzirom na kontaminaciju iz sline potrebno je u njemu određivati amilazu. Nekoliko je studija pokazalo da se uz neku mjeru sprječavanja kontaminacije slinom amilaza može otkriti samo u manjoj mjeri uzoraka u koncentraciji koja je oko 10.000 puta manja od one u slini (11, 39). Međutim, mjerenje amilaze nije specifično za salivarnu amilazu, a osim toga amilaza se može naći u plućima, tako da pozitivan rezultat testa ne znači nužno i kontaminaciju slinom. Mjerenje viskoznosti također je izvedeno, ali zbog slabije osjetljivosti primjena je te metode ograničena.

ANALIZA BIOMARKERA U KIZ-U

Analiza KIZ-a pridonosi: 1) novijim spoznajama o patološkim mehanizmima bolesti dišnog sustava praćenjem promjena razine medijatora; 2) otkrivanju sastava sekreta dišnih putova; 3) uporabi određenih medijatora kao biomarkera respiratornih bolesti.

Prema dostupnoj literaturi, najčešći biomarkeri koji se analiziraju navedeni su na tablici 2. Njihovo je djelovanje osobito važno s gledišta oksidativnog stresa, kojemu se pripisuje sve veća uloga u patofiziologiji bolesti dišnog sustava.

pH

pH KIZ-a indikator je acidifikacije dišnih putova, koja je rezultat ravnoteže različitih puferskih sustava i otpuštanja kiselina i baza unutar dišnog sustava. pH se može jednostavno mjeriti pH-elektrodama i indikatorskim bojama (7, 19). Zbog nestabilnosti pH KIZ-a potrebno je izvesti deaeraciju plinovima bez ugljikova dioksida (poput argona ili dušikova oksida). Tijekom deaeracije pH postepeno raste do točke kada

Tablica 2 Najčešće proučavani markeri

Skupina	Markeri	Bolesti
Ph		Astma, KOPB, bronhiektazije, cistična fibroza, ARDS, infekcija rinovirusom
Metaboliti arahidon-ske kiseline	Leukotrijen B4	Neutrofilne bolesti pluća -- KOPB, akutna astma, cistična fibroza, bronhiektazije, pneumonija, ARDS
	Leukotrijen C4, D4, E4	Astma
	Prostaglandin E4	Astma
	Izoprostani (8-izoPGF2 α)	Respiratorne bolesti s oksidativnim stresom u podlozi - astma, KOPB, bronhiektazije, ARDS
Proteini	Interleukini (IL-1 β , IL-4, IL-2, IL-6, IL-8)	Sve respiratorne bolesti
	TNF- α	Opći marker upale važan kod mnogih bolesti
	Amilaza	Marker kontaminacije slinom; također može reflektirati stvaranje amilaze u donjim dišnim putovima
Nukleinske kiseline	DNA (s pomoću PCR)	Karcinom pluća, potencijalan marker za procjenu mutacija
	RNA (s pomoću RT-PCR) (od engl. reverse transcriptase - polimerase chain reaction)	Istraživanje ekspresije gena, otkrivanje određenih virusa
Vazoaktivni peptidi, Amini	Acetilholin	Važan kod astme, vjerojatno kod KOPB-a
	Kateholamini	Nepoznato
	Histamin	Astma
	Serotonin	Nepoznato
Manje molekule	Tiobarbiturčni kisel reaktivni spojevi	Većina plućnih bolesti
	H ₂ O ₂	Većina plućnih bolesti
	Nitrat	Astma, KOPB, bronhiektazije, cistična fibroza, pušenje, ARDS
	Nitrit	Astma, KOPB, bronhiektazije, cistična fibroza, pušenje, ARDS
	Nitrotirozin	Astma, KOPB, bronhiektazije, cistična fibroza, pušenje, ARDS
	Urea	Potencijalni marker dilucije
	Amonijak	Hipersenzitivni indikator niskog pH
	Klorid - ostali elektroliti	Moguće za CF i ostale bolesti. Potencijalni marker dilucije.
	Surfaktant	Astma, bolest nezrelih pluća, ARDS
	Octena kiselina	Astma, infekcija rinovirusom
	Mliječna kiselina	Nepoznato
	Mravlja kiselina	Nepoznato
	Adenozin	Astma, KOPB i pušači

se može postići stabilno očitavanje (pri tome se više ne može ukloniti ugljikov dioksid deaeracijom). Kod zdravih ispitanika KIZ nakon deaeracije ima prosječan pH od 7,7, a rasponom normalnih vrijednosti smatra se 7,4 do 8,8. Prosječni dnevni i tjedni koeficijent varijabilnosti kod zdravih subjekata iznosi između 4,5 % i 3,5 % (7). Izdahnuti pH ne podliježe salivarnoj, nazalnoj i želučanoj kontaminaciji i nije pod utjecajem opstrukcije dišnih putova. Razina pH nije pod utjecajem duljine i načina prikupljanja i pohrane, dobi ispitanika, pH slina, hiperventilacije ili hipoventilacije (7). Također, pH kondenzata nije pod utjecajem amonijaka iz usne šupljine (40). Međutim uzimanje hrane ili pića

s hlapljivim kiselinama (ocat) može utjecati na test i do dva sata nakon ingestije. Mjerenje pH je izuzetno osjetljiv test, a i cijena izvođenja je prihvatljiva.

Acidifikacija dišnih putova objašnjava patologiju astme, ali i drugih bolesti dišnih putova. Za razliku od odrasle populacije, kod djece s akutnom astmom nije došlo do pada pH KIZ-a, niti do njegove promjene tijekom liječenja egzacerbacije (41). U Huntovoj studiji bolesnici s akutnom astmom imali su niže vrijednosti pH KIZ-a (5,23) u odnosu na kontrolnu skupinu (7,65), a vrijednosti su se normalizirale tijekom kortikosteroidne terapije (19). Drugi istraživači otkrili su sličan učinak kod KOPB-a i bronhiektazija (42).

Nadalje, razine pH bile su povezane s eozinofilnom i neutrofilnom upalom dišnih putova (42).

Nedavna studija utvrdila je niži pH KIZ-a kod klinički stabilnih bolesnika s CF-om (5,8) u odnosu na zdrave ispitanike (6,1), kao i daljnje smanjivanje pH kod bolesnika s CF-om tijekom akutne plućne egzacerbacije (5,2) (43). Ta opažanja povećavaju mogućnost da je kiseli okoliš dišnih putova dio patofiziologije CF-a. pH KIZ-a značajno se povećava nakon terapije antibiotikom, ali ne dostiže kontrolne razine. U drugoj studiji izmjeren je niži pH kod bronhiektatičnih bolesnika bez CF-akronično zaraženih sa *Pseudomonas aeruginosa*, u odnosu na one koji nisu zaraženi (42).

H_2O_2

H_2O_2 je metabolički produkt oksidacije prisutan u različitim vrstama stanica poput neutrofila, eozinofila, makrofaga i epitelnih stanica. Ta hlapljiva molekula nalazi se u detektabilnim koncentracijama u KIZ-u te ima manju stabilnost u odnosu na ostale markere oksidativnog stresa (npr. izoprostana). Zbog toga je uzorak potrebno odmah nakon prikupljanja zamrznuti i čuvati na $\leq -70^\circ\text{C}$ do određivanja njezine koncentracije. Zbog činjenice da se H_2O_2 u slini nalazi u 10 do 100 puta većoj koncentraciji nego u KIZ-u vrlo je važno spriječiti moguću kontaminaciju uzorka. Najčešće metode za mjerenje H_2O_2 u KIZ-u jesu kolorimetrijska i fluorimetrijska mjerenja, koja se temelje na sposobnosti H_2O_2 da reagira s prikladnom supstancijom. Izmjerene vrijednosti značajno se razlikuju i kod zdravih subjekata i kod bolesnika s različitim respiratornim bolestima i većina ih se nalazi blizu donje granice otkrivanja. Prosječni koeficijent varijabilnosti tijekom 21 dana bio je 45 % kod bolesnika s KOPB-om te 43 % kod zdravih ispitanika (25). Zbog varijabilnosti postavlja se pitanje reproducibilnosti određivanja kolorimetrijskom metodom te primjenjivosti dobivenih podataka kod monitoriranja oksidativnog stresa u dišnim putovima. Zbog toga se preporučuje uporaba osjetljivijih metoda određivanja koncentracije H_2O_2 , kao i provođenje dodatnih studija koje će odrediti korisnost ostalih metoda (npr. kemiluminiscencija ili drugih) za mjerenje H_2O_2 u KIZ-u (44-48).

Kod zdravih odraslih nepušača primijećena je široka varijabilnost u njegovoj prosječnoj koncentraciji koja se kreće od $0,01 \text{ nmol L}^{-1}$ do $0,45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (23,49). Takav bi se raspon djelomično mogao objasniti razlikama u prikupljanju uzoraka (npr. različit stupanj

protoka) i upotrebljenim analitičkim tehnikama, čime se naglašava potreba za standardizacijom eksperimentalne metodologije. Nadalje, cikardijurni ritam izdahnutog H_2O_2 , dokazan kod zdravih ispitanika s najvišim vrijednostima u 12:00 i 24:00 h, kao i kod bolesnika s KOPB-om, također doprinosi širini rezultata (23). Referentne vrijednosti izdahnutog H_2O_2 objavljene su samo za djecu školske dobi, kod koje nije nađena povezanost između razine H_2O_2 i dobi, spola ili plućne funkcije (24).

Cigaretni dim uzrokuje priljev neutrofila i drugih upalnih stanica u donje dišne putove i peterostruko više razine H_2O_2 nađene su kod pušača u odnosu na nepušače (31). Nadalje, povišene razine nađene su kod bolesnika s astmom (odrasli i djeca) (10, 49, 50), KOPB-om (37), bronhiektazijama (51, 52) i adultnim respiratornim distres sindromom (ARDS) (53), s reperfuzijskom ozljedom (54), alergijskim rinitisom (55), običnom prehladom (56), u postoperativnom periodu nakon resekcije pluća (57) i sistemskoj sklerozi (58).

U astmi, razine H_2O_2 korelirale su s brojem eozinofila u induciranom sputumu, kao i s bronhalnom reaktivnošću (17). Koncentracije izdahnutog H_2O_2 dalje rastu kod bolesnika s egzacerbacijom astme (9).

Kod bolesnika u egzacerbacijskoj fazi KOPB-a također su nađene više razine izdahnutog H_2O_2 u odnosu na bolesnike u stabilnoj fazi (37). Inhalacijski kortikosteroid beklometazon ($500 \text{ } \mu\text{g}$ dva puta na dan tijekom dva tjedna) nije utjecao na razinu H_2O_2 kod bolesnika s KOPB-om (59).

Kod bolesnika s egzacerbacijom CF-a povišena razina H_2O_2 pada nakon primjene antibiotika (60). Takav bi podatak mogao pomoći praćenju liječenja te bolesti.

Leukotrijeni

Nekoliko studija bavi se istraživanjem razine leukotrijena u KIZ-u, osobito usmjerujući pozornost na kemotaktički leukotrijen B4 (LTB4) i cisteinil leukotrijene (cys-LT: LTC4, LTD4 i LTE4) zbog njihove poznate uloge u patofiziologiji astme. Cys-LT se ponajprije proizvode u mastocitima i eozinofilima, izazivaju potiču kontrakciju glatkih mišića dišnih putova, povećavaju krvožilnu propusnost i mukoznu hipersekreciju te mijenjaju mukociliarni klirens, djelovanja koja su važna u patofiziologiji bronhalne opstrukcije. LTB4 je jak aktivator neutrofila, koji bi mogao pridonijeti oticanju dišnih putova stvarajući

lokalni edem i povećavajući mukoznu sekreciju (61). Cys-LT i LTB₄ mjere se enzimskom imunokemijskom metodom (EIA, od engl. enzyme immunoassay) čija je granica detekcije 15 pg mL⁻¹ i 4,4 pg mL⁻¹ (62-70). Raspon cys-LT koncentracija kod zdravih ispitanika u KIZ-u je između 0 pg mL⁻¹ i 25 pg mL⁻¹, a LTB₄ između 0 pg mL⁻¹ i 220 pg mL⁻¹ (63-71). Specifičnost imunoreaktivnosti LTB₄ potvrđena je HPLC metodom (od engl. high-performance liquid chromatography) (72). Prosječni dnevni koeficijent varijabilnosti za LTB₄ kod zdravih subjekata iznosi 2 % (63).

LTB₄ i cys-LT su povišeni kod bolesnika sa stabilnom umjerenom i teškom astmom (73). Nadalje, povišene koncentracije cys-LT nađene tijekom egzacerbacijske faze astme kod djece su se snizile nakon liječenja prednizolonom (64). LTB₄ je povišen kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om te dalje raste u egzacerbaciji, dok mu se razine spuštaju nakon antibiotskog liječenja (67). Carpagnano i suradnici otkrili su nedavno otkrili da su vrijednosti LTB₄ značajno povišene u KIZ-u bolesnika s CF-om tijekom akutne egzacerbacije u odnosu na kontrolne ispitanike (68).

Nitriti i nitriti

Nitriti (NO₂⁻) i nitrati (NO₃⁻) konačni su produkti metabolizma dušičnog oksida prisutni u sekretu dišnih putova (74). U KIZ-u su mjereni spektrofotometrijskom metodom (Griessova reakcija) i fluorimetrijskom metodom [2,3-diaminonaftalen (DAN) reakcija] te kemiluminiscentnim testovima. Objavljena granica detekcije kod DAN testa je 0,1 μmol L⁻¹, a kod Griessove reakcije nešto viša (75, 76). NO₂⁻ se u KIZ-u nalazi u koncentraciji oko 1 μmol L⁻¹, što je blizu granice otkrivanja za navedene testove. Kod interpretacije vrijednosti NO₂⁻ treba uzeti u obzir da on nije stabilan pri niskom pH, pa ni pri neutralnom pH. NO₃⁻ smatra se stabilnim. Nadalje, dušikovi oksidi prisutni su na laboratorijskoj površini, uključujući stakleno posuđe i pipete. Zbog toga bi istraživači trebali biti oprezni kako bi spriječili kontaminaciju uzorka. Predloženo je da se svaki materijal koji dolazi u kontakt s KIZ-om detaljno ispere visoko pročišćenom (destiliranom/deioniziranom) vodom. To je ispiranje najbolje učiniti neposredno prije uporabe, zbog činjenice da lako difuzibilan NO iz okoliša postaje oksidiran i brzo kontaminira površinu.

NO₂⁻ je u odnosu na zdrave nepušače povišen kod bolesnika s teškom astmom, KOPB-om, bronhiektazijama, CF-om te kod akutne ozljede pluća

(77, 78, 79). Pušenje uzrokuje akutno povećanje NO₃⁻, ali ne i NO₂⁻ u KIZ-u (32). Kod bolesnika s egzacerbacijom astme više NO₂⁻ razine zabilježene su u odnosu na stabilne bolesnike, a liječenje inhalacijskim steroidima rezultira značajnim smanjenjem njegove koncentracije (80, 81). Izdahnuti NO₂⁻ je također povišen kod odraslih (77) i djece (76) sa CF-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Što se tiče NO₃⁻, objavljeni su dvosmisleni rezultati jer upućuju na nepromijenjenu ili povišenu razinu u različitim stanjima dišnog sustava (42, 82).

8-izoprostan

8-izoprostan nastaje peroksidacijom arahidonske kiseline reakcijom kataliziranom slobodnim radikalima, zbog čega se smatra markerom oksidativnog stresa (83). Njegova prisutnost u KIZ-u zdravih osoba upućuje na prisutnost "fizioloških" razina oksidativnog stresa. Većina studija za njegovo mjerenje rabi komercijalno dostupne enzimске imunokemijske testove s granicom otkrivanja od 3,9 pg mL⁻¹ (66, 67, 84, 85, 86). Osjetljivija i specifičnija metoda je plinska kromatografija/spektrometrija masa (engl. gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS). Tom metodom Carpenter je našao 8-izoprostan samo kod nekih zdravih ispitanika (87), dok je Moloney našao detektabilne razine te molekule kod svih testiranih ispitanika (8).

U odnosu na zdrave pojedince, izdahnuti 8-izoprostan je povišen kod bolesnika sa stabilnom astmom, a povećanje korelira s težinom astme i stupnjem upale (84). Montuschi i suradnici pokazali su u studiji da su razine 8-izoprostana bile udvostručene u blagoj astmi u odnosu na zdrave osobe, dok su u teškoj astmi bile utrostručene (84). Unatoč liječenju oralnim i/ili višim dozama inhalacijskim steroidima, bolesnici s teškom astmom imali su visoke razine 8-izoprostana, što upućuje na to da kortikosteroidi nemaju učinak na inhibiciju oksidativnog stresa (84).

Izdahnuti 8-izoprostan je također povećan kod pušača i bivših pušača s KOPB-om (33). Slične vrijednosti 8-izoprostana u KIZ-u kod pušača i bivših pušača s KOPB-om mogle bi upućivati na to da je oksidativni stres uzrokovan kroničnim pušenjem dosegao točku kada prestanak pušenja ima malen ili nikakav učinak (33). Nije postojala povezanost između 8-izoprostana i funkcijskih plućnih testova kod bolesnika s astmom ili KOPB-om (33, 84).

Koncentracija 8-izoprostana je također povišena kod bolesnika sa CF-om te njegova razina negativno korelira s FEV1 kod istih bolesnika (86).

Najviše apsolutne vrijednosti izdahnutog 8-izoprostana nađene su u akutnoj ozljedi pluća/ARDS-u, što reflektira teški oksidativni stres povezan s tim sindromom (87).

Metaboliti arahidonske kiseline

Danas je malo poznato o prostaglandinima u KIZ-u. Iako bi PGE2 mogao imati zaštitnu ulogu u inhibiciji bronhokonstrikcije i aktivnosti upalnih stanica, on bi mogao imati i proinflamatorno djelovanje (88).

PGE2 se može mjeriti enzimskim imunokemijskim testovima i radioimunotestovima (RIA, od engl. radioimmunoassay) (73, 89-92). Granica otkrivanja za PGE2 je 8 pg mL⁻¹ (92).

PGE2 je prisutan u KIZ-u zdravih pojedinaca (73) te je povišen kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om (93). Kod tih bolesnika koncentracija PGE2 korelira s izdahnutim LTB4, upućujući na činjenicu da što je veća upala pluća, to je veća produkcija endogenih antiinflamatornih medijatora poput PGE2. Neselektivna inhibicija ciklooksigenaze (COX) oralnim ibuprofenom smanjuje izdahnuti PGE2 kod bolesnika s KOPB-om (94). Uzimajući u obzir protektivnu ulogu PGE2 u plućima, taj bi učinak mogao biti važan pri modulaciji upale dišnih putova kod KOPB-a. Učinak selektivnog COX-2-inhibitora, rofekoksiba, na izdahnuti PGE2 i kod bolesnika s KOPB-om nije poznat.

Ostale molekule

KIZ sadržava ostale molekule/obilježja koji mogu pružiti važnu informaciju uključujući mutaciju p53 (95, 96), DNA (12, 97), hepatocitni čimbenik rasta (98), vitronektin, endotelin (99) i kemotaktičku aktivnost (100). Kod bolesnika s atopijskom astmom primijećeni su manjak magnezija i porast kalcija u KIZ-u (101). Kod bolesnika s CF-om koncentracija cinka bila je povišena u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se koncentracije natrija i klora nisu značajno razlikovale (102).

Mjerenje i identifikacija proteina u KIZ-u još uvijek su kontroveržno područje. Visoke koncentracije ukupnih proteina primjećene su kod mladih pušača u odnosu na nepušače (100).

Prikupljanje KIZ-a moglo bi također biti korisno za brzo otkrivanje infektivnih procesa u plućima s pomoću PCR (engl. polymerase chain reaction) tehnologije, poput tuberkuloze (97, 103).

Citokini

Do sada je u KIZ-u otkriveno nekoliko citokina, iako su neki od njih poput IL-8 otkriveni kod malo ispitanika, a vrijednosti često uključuju nulu (12, 104-110). Koncentracije citokina u uzorcima KIZ-a obično se mjere EIA kitovima. Potreban je oprez kod primjene tih metoda zbog činjenice da je koncentracija nekih citokina prisutna oko donje granice detekcije. Kako bi se prevladao taj problem, uzorci se mogu koncentrirati prije mjerenja. Dnevni koeficijent varijacije za IL-6 iznosi 5,9 % kod zdravih ispitanika (68).

Povišene razine IL-4 i snižene razine interferona- γ opisane su kod astmatične djece (106). Liječenje kortikosteroidima bilo je povezano sa značajnom redukcijom IL-4 i povišenom razinom interferona- γ . IL-6 je nađen povišen kod bolesnika s karcinomom pluća (107), KOPB-a (108), CF-a (68) i pušača (109). Ishemija-reperfuzija povezuje se s povišenjem IL-10 u KIZ-u (110). IL-1 β je također otkriven u KIZ-u (100).

Adenozin

Adenozin je produkt raspadanja adenozin trifosfata te ima široko područje djelovanja na dišni sustav putem svojih specifičnih receptora (111). U KIZ-u se mjeri HPLC-metodom. Granica otkrivanja te metode iznosi 2 nmol L⁻¹. Raspon vrijednosti adenozina kod zdravih ispitanika je između 0 nmol L⁻¹ i 20 nmol L⁻¹. Prosječan dnevni koeficijent varijabilnosti iznosi 10 % kod zdravih ispitanika (39).

Njegova razina u KIZ-u povišena je kod bolesnika s alergijskim rinitisom (89) i astmatičara s posljedičnim preklapanjem između zdravih vrijednosti u oba stanja (39). Kod bolesnika s pogoršanjem simptoma astme koncentracija adenozina u KIZ-u bila je viša od one u stabilnoj fazi bolesti (39).

ZAKLJUČAK

Medijatori/obilježja KIZ-a predstavljaju širok raspon varijabli od protona do DNA-fragmenata. Zbog njihovih različitih biokemijskih obilježja (hlapljivost, stabilnost, molekularna težina itd.) svaki od njih zahtijeva posebno razmatranje u kontekstu mjerenja njihove prisutnosti u KIZ-u. Osim toga, postojeće analitičke metode često su ograničene vrijednosti jer su biomarkeri prisutni u niskim koncentracijama. Mjerenja upalnih medijatora u KIZ-u osiguravaju pogled u patofiziologiju bolesti plućnog sustava. Najveća prednost ove metode očituje se u sljedećim

činjenicama: (1) metoda je u cijelosti neinvazivna; (2) lako je izvediva; (3) prikladna za ponavljana mjerenja upale tijekom stabilne i/ili egzacerbacijske faze plućnih bolesti i (4) potencijalno korisna za procjenu učinkovitosti pojedinih lijekova. Karakterizacija profila izdahnutih markera, poput eikozanoida, mogla bi biti važna u diferencijalnoj dijagnozi upalnih plućnih bolesti. Međutim, potrebno je razjasniti nekoliko metodoloških tema, poput standardizacije prikupljanja uzoraka i validacije analitičkih tehnika. Nadalje, studije o učinkovitosti lijekova na markere KIZ-a najčešće su opažajne te su potrebne kontrolirane studije koje će potvrditi njihovu primjenu u vođenju liječenja upalnih bolesti dišnog sustava.

Buduća istraživanja u ovom području uključuju: (1) određivanje referentnih vrijednosti različitih upalnih biomarkera kod zdrave populacije; (2) studije reproducibilnosti mjerenja; (3) velike longitudinalne studije; (4) moguće povezanosti markera KIZ-a sa simptomima i znakovima plućne funkcije te ostalih metoda za kvantifikaciju upale dišnih putova; i (5) istraživanja mehanizama stvaranja KIZ-a i njegove povezanosti sa sekretom dišnog sustava. Kada će ova metoda biti klinički dostupna, teško je predvidjeti. Međutim, zbog važnosti upale u patofiziologiji mnogih plućnih bolesti poput astme, KOPB-a, i relativni nedostatak neinvazivnih metoda za monitoriranje upale dišnih putova i terapijske intervencije, potrebna su daljnja istraživanja na tom području.

LITERATURA

1. Zdravstveno stanje hrvatskog pučanstva u 1999. godini. Kronične nezarazne bolesti. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Dostupno na: URL: http://www.hzjz.hr/epidemiologija/kron_bol.htm
2. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:731-7.
3. Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI. Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Ter Arkh* 1980;52(3):65-8.
4. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. On behalf of the ATS/ERS task force on exhaled breath condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26:523-48.
5. Griesse M, Noss J, von Bredow C. Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva. *Proteomics* 2002;2:690-6.
6. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Seyfarth HJ, Sack U, Engelmann L, Schauer J, Wirtz H. Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir Med* 2003;97:1188-94.
7. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, Urban P, Hom S, Gaston B, Hunt J. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J* 2003;22:889-94.
8. Moloney ED, Mumby SE, Gajdosi R, Cranshaw JH, Kharitonov SA, Quinlan GJ, Griffiths MJ. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:64-9.
9. Dohlman AW, Black HR, Royall JA. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:955-60.
10. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J* 1997;10:519-21.
11. Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, Gare M, Lin W, Sun F. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;65:663-9.
12. Scheideler L, Manke HG, Schwulera U, Inacker O, Hammerle H. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am Rev Respir Dis* 1993;148:778-84.
13. Fairchild CI, Stampfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987;48:948-9.
14. Kietzmann D, Kah R, Muller M, Burchardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 1993;19:78-81.
15. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, Nahum A, Factor P, Wood LD. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989;96:606-12.
16. Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jorres RA. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J* 2000;16:1115-8.
17. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1042-10.
18. Griesse M., Latzin P, Beck J. A non-invasive method to collect nasally exhaled air condensate in humans of all ages. *Eur J Clin Invest* 2001;31:915-20.
19. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, Gaston B. Endogenous airway acidification: implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:694-9.

20. Arias-Diaz J, Vara E, Torres-Melero J, Garcia C, Baki W, Ramirez-Armengol JA, Balibrea JL. Nitrite/nitrate and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Cancer* 1994;74:1546-51.
21. Pheng LH, Francoeure C, Denis M. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 1995;19:599-610.
22. Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, Fujii T, Kawaguchi T, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:624-9.
23. Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Krol M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001;30:178-86.
24. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellenkes SL, Hop WCJ, Hermans PWM, de Jongste JC. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 1998;12:483-5.
25. Van Beurden WCJ, Dekhuijzen PNR, Harff GA, Smeenk FWJM. Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD and matched healthy controls. *Respiration* 2002;69:211-6.
26. Gessner C, Kuhn H, Seyfarth H-J, Pankau H, Winkler J, Schauer J, Wirtz H. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 2001;55:414-9.
27. Baraldi E, Ghirio L, Piovani V, Carraro S, Zacchello F, Zanconato S. Safety and success of exhaled breath condensate collection in asthma. *Arch Dis Child* 2003;88:358-60.
28. Cheah FC, Darlow BA, Winterbourn CC. Problems associated with collecting breath condensate for the measurement of exhaled hydrogen peroxide from neonates on respiratory support. *Biol Neonate* 2003;84:338-41.
29. Latzin P, Beck J, Bartenstein A, Griesse M. Comparison of exhaled breath condensate from nasal and oral collection. *Eur J Med Res* 2003;8:505-10.
30. Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med J* 2000;118:93-8.
31. Nowak D, Antczak A, Krol M, Pietras T, Shariati B, Bialasiewicz P, Jeczowski K, Kula P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996;9:652-7.
32. Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 2001;56:456-61.
33. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1175-7.
34. Garey KW, Neuhauser MM, Rafice AL, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Protein, nitrite/nitrate, and cytokine concentration in exhaled breath condensate of young smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: A175.
35. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Balint B, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide concentrations in asthmatic smokers. *Respiration* 2004;71:463-8.
36. Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P. Increased content of thiobarbituric acid reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med* 1999;93:389-96.
37. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:813-6.
38. Nowak D, Kasielski M, Pietras T, Bialasiewicz P, Antczak A. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998;53:268-73.
39. Huszar E, Vass G, Vizi E, Csoma Z, Barat E, Molnar Vilagos G, Herjavec I, Horvath I. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J* 2002;20:1393-8.
40. Wells K, Vaughan J, Pajewski TN. Exhaled breath condensate pH assay not influenced by oral ammonia. *Thorax* 2005;60:27-31.
41. MacGregor G, Ellis S, Andrews J, Imrie M, Innes A, Greening AP, Cunningham S. Breath condensate ammonium is lower in children with chronic asthma. *Eur Respir J* 2005;26:271-6.
42. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1364-70.
43. Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes J, Greening A. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002;57:926-9.
44. De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, Spacone A, Formisano S, Cocco R, Sanguinetti CM. Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000;55:185-8.
45. Van Beurden WJ, Harff GA, Dekhuijzen PN, van den Bosch MJ, Creemers JP, Smeenk FW. An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir Med* 2002;96:197-203.
46. Zappacosta B, Persichilli S, Mormile F, Minucci A, Russo A, Giardina B, De Sole P. A fast chemiluminescence method for hydrogen peroxide measurement in exhaled

- breath condensate. *Clin Chim Acta* 2001;310:187-91.
47. Razola SS, Ruiz BL, Diez NM, Mark HB Jr, Kauffmann JM. Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. *Biosens Bioelectron* 2002;17:921-8.
 48. Thanachasai S, Rokutanzone S, Yoshida S, Watanabe T. Novel hydrogen peroxide sensors based on peroxidasecarrying poly[pyrrole-co-[4-(3-pyrrolyl)butan esulfonate] copolymer films. *Anal Sci* 2002;18:773-7.
 49. Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997;10:1235-41.
 50. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, Barnes PJ. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 2001;120:1136-9.
 51. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Lachanis S, Panagou P, Siafakas NM. Exhaled H₂O₂ in steady state bronchiectasis: relationship with cellular composition in induced sputum, spirometry, and extent and severity of diseases. *Chest* 2002;121:81-7.
 52. Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:991-4.
 53. Wilson WC, Swetland JF, Benumof JL, Laborde P, Taylor R. General anesthesia and exhaled breath hydrogen peroxide. *Anesthesiology* 1992;76:703-10.
 54. Wilson WC, Laborde PR, Benumof JL, Taylor R, Swetland JF. Reperfusion injury and exhaled hydrogen peroxide. *Anesth Analg* 1993;77:963-70.
 55. Sandrini A, Ferreira IM, Jardim JR, Zamel N, Chapman KR. Effect of nasal triamcinolone on lower airway inflammatory markers in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:313-20.
 56. Jobsis Q, Schellenkens SL, Fakkkel-Kroesbergen A, Raatgreep HC, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in breath condensate during a common cold. *Mediators Inflam* 2001;10:351-4.
 57. Lases EC, Duurkens VA, Gerritsen WB, Haas FJ. Oxidative stress after lung resection therapy: a pilot study. *Chest* 2000;117:999-1003.
 58. Luczynska M, Szkudlarek U, Dzianowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Kasielski M, Sysa-Jedrzejowska A, Nowak D. Elevated exhalation of hydrogen peroxide in patients with systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest* 2003;33:274-9.
 59. Ferreira IM, Hazari MS, Gutierrez C, Zamel N, Chapman KR. Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: effects of inhaled beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1012-5.
 60. Jobsis Q, Raatgreep HC, Schellenkens SL, Kroesbergen A, Hop WC, de Jongste JC. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Eur Respir J* 2000;16:95-100.
 61. Claesson HE, Odlander B, Jakobsson PJ. Leukotriene B₄ in the immune system. *Int J Immunopharmacol* 1992;14:441-9.
 62. Reinhold P, Becher G, Rothe M. Evaluation of the measurement of leukotriene B₄ concentrations in exhaled condensate as a noninvasive method for assessing mediators of inflammation in the lungs of calves. *Am J Vet Res* 2000;61:742-9.
 63. Csoma Zs, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1345-9.
 64. Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghiro L, Bodini A, Piacentini G, Zacchello F, Zanconato S. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Thorax* 2003;58:505-9.
 65. Bodini A, Peroni D, Vicentini L, Loiacono A, Baraldi E, Ghiro L, Corradi M, Alinovi R, Boner AL, Piacentini GL. Exhaled breath condensate eicosanoids and sputum eosinophils in asthmatic children: a pilot study. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:26-31.
 66. Zanconato S, Carraro S, Corradi M, Alinovi R, Pasquale MF, Piacentini G, Zacchello F, Baraldi E. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:257-63.
 67. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B₄ and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbation of COPD. *Thorax* 2003;58:294-8.
 68. Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B₄ and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1109-12.
 69. Neubauer B, Struck N, Mutzbauer TS, Schotte U, Langfeldt N, Tetzl K. Leukotriene-B₄ concentrations in exhaled breath condensate and lung function after thirty minutes of breathing technically dried compressed air. *Int Marit Health* 2002;53:93-101.
 70. Becher G, Winsel K, Beck E, Neubauer G, Stresemann E. Leukotriene B₄ in breathing condensate of patients with bronchopulmonary diseases and of normal patients. *Appl Cardiopulmon Pathophysiol* 1995;5:215-9.
 71. Sandrini A, Ferreira IM, Gutierrez C, Jardim JR, Zamel N, Chapman KR. Effect of montelukast on exhaled nitric oxide and nonvolatile markers of inflammation in mild asthma. *Chest* 2003;124:1334-40.
 72. Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S, Corbo G, Mondino

- C, Ciappi G, Barnes PJ, Ciabattani G. Validation of leukotriene B4 measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res* 2003;52:69-73.
73. Montuschi P, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:615-20.
74. Van der Vliet, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1-9.
75. Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T, Donnelly LE, Shah PL, Hodson ME, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:1201-7.
76. Cunningham S, McColm JR, Ho LP, Greening AP, Marshall TG. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000;15:955-7.
77. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998;53:680-4.
78. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Lange T, Engelmann L, Schauer J, Wirtz H. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003;124:1046-52.
79. Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Resp Med* 2001;95:649-54.
80. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995;346:1235-6.
81. Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, Collins JV, Barnes PJ. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax* 2002;57:889-96.
82. Corradi M, Pesci A, Casana R, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Cuomo A. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* 2003;8:26-30.
83. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:1067-82.
84. Montuschi P, Corradi M, Ciabattani G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216-20.
85. Montuschi P, Ciabattani G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1524-7.
86. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattani G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000;55:2058-9.
87. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998;114:1653-9.
88. Pavord ID, Tattersfield AE. Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E2. *Lancet* 1995;334:436-8.
89. Vass G, Huszárik E, Bara't E, Valyon M, Kiss D, Penzes I, Augusztinovicz M, Horvath I. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:850-5.
90. Antczak A, Montuschi P, Kharitonov SA, Gorski P, Barnes PJ. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:301-6.
91. Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S, Corbo G, Mondino C, Ciappi G, Ciabattani G. Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E2 measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res* 2003;52:502-7.
92. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Prostaglandin E2 in the expired breath condensate of patients with asthma. *Eur Respir J* 2003;22:743-7.
93. Montuschi P, Kharitonov SA, Carpagnano E, Culpitt S, Russell R, Collins JV, Barnes PJ. Exhaled prostaglandin E2: a new biomarker of airway inflammation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:A821.
94. Montuschi P. Non selective cyclooxygenase inhibition decreases exhaled prostaglandin E2 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A908.
95. Gessner C. Detection of mutations of the K-ras gene in condensed breath of patients with non small cell lung cancer (NSLC) as a possible non-invasive screening method. *Pneumologie* 1998;52:426-7.
96. Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammersmidt S, Schauer J, Wirtz H. Detection of p53 mutations in exhaled breath condensate of non small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2004;43:215-22.
97. Vogelberg C, Hirsch T, Rosen-Wolff A, Kerkmann M-L, Leupold W. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* cannot be detected by PCR in the breath condensate of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:348-52.
98. Nayeri F, Millinger E, Nilsson I, Zetterstrom, Brudin L, Forsberg P. Exhaled breath condensate and serum levels of hepatocyte growth factor in pneumonia. *Respir Med* 2002;96:115-9.
99. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Wells A, Pantelidis P, Du Bois RM, Barnes PJ. Increased vitronectin and endothelin-1 in the breath condensate of patients with fibrosing lung disease. *Respiration* 2003;70:154-60.

100. Garey K, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Respiration* 2004;71:463-8.
101. Emel'ianov AV, Petrova MA, Lavrova OV, Guleva LI, Dolgodvorov AF, Fedoseev GB. Disorders in mineral metabolism at different stages of the development of bronchial asthma. *Terapevticheski Archiv* 1995;67:45-7.
102. Griese M, Noss J, Schramel P. Elemental and ion composition of exhaled air condensate in cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 2003;2:136-42.
103. Schreiber J, Meyer C, Rusch-Gerdes S, Richter E, Beck H, Fischer JF, Rosahl W. Mycobacterium tuberculosis gene-amplification in breath condensate of patients with lung tuberculosis. *Eur J Med Res* 2002;7:290-1.
104. Ho LP, Faccenda J, Innes JA, Greening AP. Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 1999;13:103-6.
105. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 2002;122:1162-7.
106. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Increased interleukin-4 and decreased interferon- γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1290-3.
107. Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Carpagnano F. Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2002;17:141-5.
108. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PL. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate in patients with COPD. *Respir Med* 2003;97:1299-302.
109. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J* 2003;21:589-93.
110. McRae K, De Perrot M, Fischer S, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. Detection of IL-10 in the exhaled breath condensate, plasma and tissue during ischemiareperfusion injury in experimental lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:184.
111. Fozard JR. The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:264-9.
112. Exhaled Breath Condensate: An Introduction. [pristup listopada 2005.]. Dostupno na: <http://www.respiratoryresearch.com>.

Summary

THE IMPORTANCE OF EXHALED BREATH CONDENSATE ANALYSIS IN DIAGNOSING A LUNG DISEASE

Exhaled breath condensate (EBC) contains aerosolised airway lining fluid and volatile compounds that provide non-invasive insight in biochemical and inflammatory activities in the lung. The interest in EBC has grown rapidly since this easily sampled fluid showed measurable properties that clearly indicate a disease. EBC assays provide evidence of redox deviation, acid-base status, and of the degree and type of inflammation in acute and chronic asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cystic fibrosis, adult respiratory distress syndrome, and other lung diseases. Because of uncertain and variable degrees of dilution, EBC does not provide precise assessment of individual solute concentrations within native airway lining fluid. However, it can provide information when concentrations differ substantially between health and disease. Because, EBC assays are approachable and easy to perform, they will become integral components of future clinical studies, and after standardisation is accomplished, they might be used to diagnose and monitor therapy in clinical practice.

KEY WORDS: *biomarkers, cytokines, hydrogen-ion concentration, hydrogen peroxide, oxidative stress*

REQUESTS FOR REPRINTS:

Ivana Maloča, dr. med.
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
p.p. 291, HR-10001 Zagreb
E-mail: imaloca@imi.hr